

16. 4. 2004

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

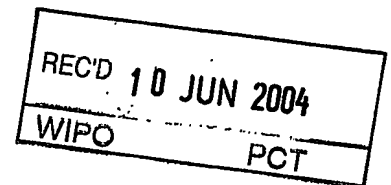
別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日
Date of Application: 2003年 4月18日

出願番号
Application Number: 特願2003-114382
[ST. 10/C]: [JP2003-114382]

出願人
Applicant(s): アークレイ株式会社

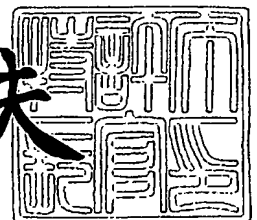


PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2004年 5月27日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今井康夫



BEST AVAILABLE COPY

出証番号 出証特2004-3045083

【書類名】 特許願

【整理番号】 P-B1032

【提出日】 平成15年 4月18日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12N 15/09
C12Q 1/68

【発明の名称】 ミトコンドリアDNA 3 2 4 3 変異の検出法ならびにそのための核酸プローブおよびキット

【請求項の数】 9

【発明者】

【住所又は居所】 京都府京都市南区東九条西明田町 5 7 アークレイ株式会社内

【氏名】 平井 光春

【特許出願人】

【識別番号】 000141897

【氏名又は名称】 アークレイ株式会社

【代理人】

【識別番号】 100100549

【弁理士】

【氏名又は名称】 川口 嘉之

【選任した代理人】

【識別番号】 100090516

【弁理士】

【氏名又は名称】 松倉 秀実

【選任した代理人】

【識別番号】 100089244

【弁理士】

【氏名又は名称】 遠山 勉

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 192372

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 ミトコンドリアDNA 3243 変異の検出法ならびにそのための核酸プローブおよびキット

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 末端が蛍光色素で標識され、ハイブリダイゼーションしたときに蛍光色素の蛍光が減少する核酸プローブであって、配列番号 2 に示す塩基配列において塩基番号230から始まる14～40塩基長の塩基配列に相補的な塩基配列を有し、3' 末端が蛍光色素で標識されている前記核酸プローブ。

【請求項 2】 核酸プローブが、配列番号 13 または 14 に示す塩基配列を有する請求項 1 記載の核酸プローブ。

【請求項 3】 一塩基多型の部位を有する核酸について、蛍光色素で標識された核酸プローブを用いて、蛍光色素の蛍光を測定することにより融解曲線分析を行い、融解曲線分析の結果に基づいて変異を検出する方法であって、一塩基多型は、ミトコンドリアDNAにおける3243位の変異であり、核酸プローブは、請求項 1 または 2 に記載の核酸プローブである前記方法。

【請求項 4】 試料に含まれる核酸における一塩基多型の部位を含む領域を増幅して一塩基多型を有する核酸を得ることを含む請求項 3 記載の方法。

【請求項 5】 増幅をDNAポリメラーゼを用いる方法により行う請求項 4 記載の方法。

【請求項 6】 増幅を核酸プローブの存在下で行う請求項 5 記載の方法。

【請求項 7】 末端が蛍光色素で標識され、ハイブリダイゼーションしたときに蛍光色素の蛍光が減少する核酸プローブであって、配列番号 2 に示す塩基配列において塩基番号230から始まる14～40塩基長の塩基配列に相補的な塩基配列を有し、3' 末端が蛍光色素で標識されている前記核酸プローブを含む、請求項 3 記載の方法のためのキット。

【請求項 8】 核酸プローブが、配列番号 13 または 14 に示す塩基配列を有する請求項 7 記載のキット。

【請求項 9】 ミトコンドリアDNAにおける3243位の変異を含む領域を、DNAポリメラーゼを用いる方法で増幅するためのプライマーをさらに含む請求項 7

または8記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、ミトコンドリアにおける3242変異の検出法およびそのためのキットに関する。

【0002】

【従来の技術】

ミトコンドリアDNA 3243部位のA→G変異 (mt3243) は日本人糖尿病患者の1%に存在する変異で、単一遺伝子異常による糖尿病の中で、最も高頻度である。ミトコンドリア遺伝子異常の特徴の一つは正常と異常のミトコンドリアDNAが様々な割合で共存することであり、この状態をヘテロプラスミーと呼ぶ。mt3243変異のヘテロプラスミーの比率と病状の進行度には相関があるといわれており、病状の進行度や治療効果の測定に用いることが出来るのではないかと考えられる。

【0003】

mt3243変異は変異が存在するとその部分に制限酵素の認識部位が出現するため、PCRで変異部分を含むように増幅を行い、制限酵素で切断し、その後電気泳動で切断されたかどうかを検出するという方法 (PCR-RFLP) で検出を行うことが出来る (例えば非特許文献1 参照)。

【0004】

PCRは数分子の鋳型から数10億倍もの分子を増幅するため、増幅産物がほんの少し混入した場合でも偽陽性、偽陰性の原因になり得る。PCR-RFLPはPCR反応後に増幅産物を取り出して制限酵素処理を行うという必要があるため、増幅産物が次の反応系に混入する恐れがある。よって、偽陽性、偽陰性の結果が得られてしまうことがある。さらに、PCR終了後、制限酵素で処理を行い、その後電気泳動を行うため、検出に必要な時間も非常に長くかかってしまう。また、操作が複雑なため、自動化が困難である。

【0005】

一方、一般に、変異を含む領域をPCRで増幅した後、蛍光色素で標識された核

酸プローブを用いて融解曲線分析を行い、融解曲線分析の結果に基づいて変異を解析する方法が知られている（非特許文献2、特許文献1）。

【0006】

【非特許文献1】

臨床病理、1996年、第44巻、第8号、p. 778-782

【非特許文献2】

クリニカルケミストリー(Clinical Chemistry)、2000年、第46巻、第5号、
p. 631-635

【特許文献1】

特開2002-119291号公報

【0007】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の課題は、mt3243変異を検出するのに有効な消光プローブを特定し、mt3243変異を検出する方法およびそのためのキットを提供することを課題とする。

【0008】

【課題を解決するための手段】

上述のプローブを用いる方法に関する文献においては、プローブの設計に関し、末端部が蛍光色素により標識された消光プローブが標的核酸にハイブリダイゼーションしたとき、末端部分においてプローブ-核酸ハイブリッドの複数塩基対が少なくとも一つのGとCのペアを形成するように設計するという教示があるのみである。本発明者らは、mt3243変異に関し、上記条件を満たす消光プローブを設計し、検出を試みたが、容易に検出を可能とする消光プローブは得られなかった。

【0009】

本発明者らは、mt3243変異を含む特定の領域に基づいて消光プローブを設計することにより、消光プローブを用いる融解曲線分析によりmt3243変異を検出できることを見出し、本発明を完成した。

本発明は、以下のものを提供する。

【0010】

(1) 末端が蛍光色素で標識され、ハイブリダイゼーションしたときに蛍光色素の蛍光が減少する核酸プローブであって、配列番号 2 に示す塩基配列において塩基番号 230 から始まる 14~40 塩基長の塩基配列に相補的な塩基配列を有し、3' 末端が蛍光色素で標識されている前記核酸プローブ。

【0011】

(2) 核酸プローブが、配列番号 13 または 14 に示す塩基配列を有する (1) の核酸プローブ。

【0012】

(3) 一塩基多型の部位を有する核酸について、蛍光色素で標識された核酸プローブを用いて、蛍光色素の蛍光を測定することにより融解曲線分析を行い、融解曲線分析の結果に基づいて変異を検出する方法であって、一塩基多型は、ミトコンドリア DNA における 3243 位の変異であり、核酸プローブは、(1) または (2) の核酸プローブである前記方法。

【0013】

(4) 試料に含まれる核酸における一塩基多型の部位を含む領域を増幅して一塩基多型を有する核酸を得ることを含む (3) の方法。

【0014】

(5) 増幅を DNA ポリメラーゼを用いる方法により行う (4) の方法。

【0015】

(6) 増幅を核酸プローブの存在下で行う (5) の方法。

【0016】

(7) 末端が蛍光色素で標識され、ハイブリダイゼーションしたときに蛍光色素の蛍光が減少する核酸プローブであって、配列番号 2 に示す塩基配列において塩基番号 230 から始まる 14~40 塩基長の塩基配列に相補的な塩基配列を有し、3' 末端が蛍光色素で標識されている前記核酸プローブを含む、(3) の方法のためのキット。

【0017】

(8) 核酸プローブが、配列番号 13 または 14 に示す塩基配列を有する (7) のキット。

【0018】

(9) ミトコンドリアDNAにおける3243位の変異を含む領域を、DNAポリメラーゼを用いる方法で増幅するためのプライマーをさらに含む(7)または(8)のキット。

【0019】

【発明の実施の形態】

<1>本発明プローブおよび本発明検出方法

本発明プローブは、末端が蛍光色素で標識され、ハイブリダイゼーションしたときに蛍光色素の蛍光が減少する核酸プローブであって、配列番号2に示す塩基配列において塩基番号230から始まる14~40塩基長の塩基配列に相補的な塩基配列を有し、3'末端が蛍光色素で標識されていることを特徴とする。

【0020】

本発明プローブは、配列番号2に示す塩基配列(mt3243変異における変異型の塩基を有する配列)において塩基番号230から始まる14~40塩基長の塩基配列に相補的な塩基配列を有する他は、特許文献1に記載された消光プローブと同様でよい。本発明に使用される消光プローブの塩基配列の例としては、配列番号13または14に示すものが挙げられる。蛍光色素としては、特許文献1に記載されたものが使用できるが、具体例としては、FAM(商標)、TAMRA(商標)、BODIPY(商標) FL等が挙げられる。蛍光色素のオリゴヌクレオチドへの結合方法は、通常の方法、例えば特許文献1に記載の方法に従って行うことができる。

【0021】

本発明検出方法は、一塩基多型の部位を有する核酸について、蛍光色素で標識された核酸プローブを用いて、蛍光色素の蛍光を測定することにより融解曲線分析を行い、融解曲線分析の結果に基づいて変異を検出する方法であって、一塩基多型は、mt3243変異であり、核酸プローブは本発明プローブであることを特徴とする。

【0022】

本発明検出方法は、mt3243変異を含む領域を増幅すること、および、本発明プローブを用いることの他は、通常の核酸増幅および融解曲線分析(T_m解析)の方

法に従って行うことができる。

【0023】

核酸増幅の方法としては、PCRポリメラーゼを用いる方法が好ましく、その例としては、PCR、ICAN、LAMP等が挙げられる。PCRポリメラーゼを用いる方法により増幅する場合は、本発明プローブの存在下で増幅を行うことが好ましい。用いるプローブに応じて、増幅の反応条件等を調整することは当業者であれば容易である。これにより、核酸の増幅後にプローブの T_m を解析するだけなので、反応終了後増幅産物を取り扱う必要がない。よって、増幅産物による汚染の心配がない。また、増幅に必要な機器と同じ機器で検出することが可能なので、容器を移動する必要すらない。よって、自動化も容易である。

【0024】

以下、PCRを用いる場合を例として、さらに説明する。PCRに用いるプライマー対は、本発明プローブがハイブリダイゼーションできる領域が増幅されるようにする他は、通常のPCRにおけるプライマー対の設定方法と同様にして設定することができる。プライマーの長さおよび T_m は、通常には、12mer~40merで40~70℃、好ましくは16mer~30merで55~60℃である。プライマー対の各プライマーの長さは同一でなくてもよいが、両プライマーの T_m はほぼ同一（通常には、相違が2℃以内）であることが好ましい。なお、 T_m 値は最近接塩基対(Nearest Neighbor)法により算出した値である。プライマー対の例としては、配列番号2および3に示す塩基配列を有するプライマーからなるものが挙げられる。

【0025】

PCRは、本発明で使用する本発明プローブの存在下で行うことが好ましい。これにより、増幅反応終了後に増幅産物を取り扱う操作を行うことなく T_m 解析を行うことができる。用いるプローブに応じて、プライマーの T_m やPCRの反応条件を調整することは当業者であれば容易である。

【0026】

代表的なPCR反応液の組成を挙げれば、以下の通りである。

【0027】

【表1】

DNA断片	$10^1 \sim 10^8$ 分子/反応
プライマー	200~1000 nM
プローブ	100~1000 nM
ヌクレオチド	各20~200 μ M
DNAポリメラーゼ	0.01~0.03単位/ μ l
Tris-HCl (pH 8.4~9.0)	5~20mM
MgCl ₂	1.5~3mM
KCl	10~100mM
グリセロール	0~20%

(最終液量：10~100 μ l)

【0028】

また、代表的な温度サイクルを挙げれば、以下の通りであり、この温度サイクルを通常25~40回繰り返す。

- (1) 変性、90~98℃、1~60秒
- (2) アニールリング、60~70℃、10~60秒
- (3) 伸長、60~75℃、10~180秒

【0029】

アニールリングおよび伸長を一ステップで行う場合には、60~70℃、10~180秒の条件が挙げられる。

【0030】

T_m解析は、本発明プローブの蛍光色素の蛍光を測定する他は通常の方法に従って行うことができる。蛍光の測定は、蛍光色素に応じた波長の励起光を用い発光波長の光を測定することに行うことができる。T_m解析における昇温速度は、通常には、0.1~1℃/秒である。T_m解析を行うときの反応液の組成は、プローブとその塩基配列に相補的な配列を有する核酸とのハイブリダイゼーションが可能であれば特に制限されないが、通常には、一価の陽イオン濃度が1.5~5 mM、pHが7~9である。PCR等のDNAポリメラーゼを用いる増幅方法の反応液は、通常、この条件を満たすので、増幅後の反応液をそのままT_m解析に用いることができる。

【0031】

T_m解析の結果に基づくmt3243変異の検出は通常の方法に従って行うことができる。本発明における検出とは、変異の有無の検出の他、変異型DNAの定量、野生型DNAと変異型DNAの割合の測定も包含する。

【0032】

<2>本発明キット

本発明キットは、本発明の検出方法に用いるためのキットである。このキットは、末端が蛍光色素で標識され、ハイブリダイゼーションしたときに蛍光色素の蛍光が減少する核酸プローブ（消光プローブ）であって、配列番号2に示す塩基配列において塩基番号230から始まる14～40塩基長の塩基配列に相補的な塩基配列を有し、3'末端が蛍光色素で標識されている核酸プローブを含むことを特徴とする。

【0033】

消光プローブについては、本発明プローブに関し、上記に説明した通りである。

【0034】

本発明検出キットは、消光プローブの他に、本発明の検出方法における核酸増幅を行うのに必要とされる試薬類、特にDNAポリメラーゼを用いる増幅のためのプライマーをさらに含んでもよい。

【0035】

本発明検出キットにおいて消光プローブ、プライマーおよびその他の試薬類は、別個に収容されていてもよいし、それらの一部が混合物とされていてもよい。

【0036】

【実施例】

以下に、本発明を実施例により具体的に説明する。

【0037】

【実施例1】

ヒトミトコンドリア3243A→G変異（mt3243変異）の部位を含む塩基配列（配列番号2、塩基番号243がミトコンドリア遺伝子3243位に相当）に基づき、mt3243変異を含む部分を増幅できるように表2に示すプライマーを設計した。表2中

、位置は、配列番号 1 に示す塩基配列における塩基番号を示す。

【0038】

【表 2】

プライマー

名称	配列(5'→3')	mer	位置	配列番号
F-27	catctcaacttagtattataccacac	27	184-210	3
R-22	agaggaattgaacctctgactg	22	296-275	4

【0039】

次に、表 3 に示す、末端部に C を有するプローブを設計した。表 3 中、位置は、配列番号 1 に示す塩基配列における塩基番号を示す。また、塩基配列中の大文字は、mt3243 変異の部位を示し、3' 末端の (P) は、リン酸化されていることを示す。BODIPY (商標) FL 又は TAMRA (商標) による標識は、常法に従って行った。

【0040】

【表 3】

プローブ

名称	配列(5'→3')	mer	位置	配列番号
3FL-mt-F3-20	tttgtaagatggcagGgcc-(BODIPY FL)	20	227-246	5
3T-mt-F2-21	tttgtaagatggcagGgccc-(TAMRA)	21	227-247	6
3T-mt-R1-22	gcgattaccgggcCctgccatc-(TAMRA)	22	256-235	7
5T-mt-R2-20	(TAMRA)-ccgggcCctgccatcttaac-(P)	20	249-230	8
3T-mt-F2-17	ttaagatggcagGgccc-(TAMRA)	17	231-247	9
3T-mt-F3-16	ttaagatggcagGgcc-(TAMRA)	16	231-246	10
3T-mt-R1-20	gattaccgggcCctgccatc-(TAMRA)	20	254-235	11
3T-mt-F1-16	gcagGgcccggtaatc-(TAMRA)	16	239-254	12
3T-mt-R2-18	gggcCctgccatcttaac-(TAMRA)	18	247-230	13
3T-mt-R2-17	ggcCctgccatcttaac-(TAMRA)	17	246-230	14
3FL-mt-R2-18	gggcCctgccatcttaac-(BODIPY FL)	18	247-230	13
3FL-mt-R2-17	ggcCctgccatcttaac-(BODIPY FL)	17	246-230	14

【0041】

mt3243変異周辺領域を組み込んだプラスミドをサンプルとして、Smart Cycler System (Cepheid)を用い、以下の条件でPCRおよびT_m解析を行った。T_m解析における励起波長および検出波長は、それぞれ450~495 nmおよび505~537 nm (BODIPY FL)、527~555 nmおよび565~605 nm (TAMRA) であった。

【0042】

【表4】

反応液組成

H ₂ O	15.995 μ L
10×Gene Taqバッファー	2.5 μ L
40% グリセロール	3.125 μ L
各10mM dATP, dUTP, dGTP, dCTP	0.5 μ L
2U/ μ L ウラシル-N-グリコシラーゼ	0.05 μ L
5 μ M プローブ	1 μ L
100mM MgCl ₂	0.375 μ L
100 μ M プライマーF-27	0.25 μ L
100 μ M プライマーR-22	0.125 μ L
5U/ μ L Gene Taq FP	0.125 μ L
サンプル (0~2000コピー)	1 μ L
合計	25 μ L

【0043】

【表5】

反応条件

50°C, 2min

↓

95°C, 2min

↓

95°C, 1sec

66°C, 18sec (50サイクル)

↓

T_m解析 (1℃/sec)

【0044】

各プローブを用いてPCRおよびT_m解析を行った結果、プローブ3T-mt-R2-18、3T-mt-R2-17、3FL-mt-R2-18および3FL-mt-R2-17を用いたときのみ、T_m解析で解析の可能な蛍光強度の変化が認められた。なお、各プローブのmt3243変異を含む塩基配列に対する配置を図1および2に示す。図中、Wild配列およびmutant配列は、それぞれ配列番号1および2の塩基配列の塩基番号214~263である。また、図中、Fは蛍光色素を示す。図1および2に示す配置からみて、プローブがT_m解析で利用できるかどうかは、蛍光色素を結合させたCの位置に依存すると考えられ、プローブの長さは、多型部位を含む限り、あまり重要でないと考えられる。

【0045】

サンプルとして、種々の比率で、変異型配列を有するプラスミドと正常型配列を有するプラスミドを含むサンプルとの混合物を調製し、プローブ3FL-mt-R2-17を用いて定量を行った。結果を図3に示す。変異型配列の比率にかかわらず、変異型配列と正常型配列が明確に区別して検出できた。

【0046】

プローブとして、プローブ3T-mt-R2-18、3T-mt-R2-17および3FL-mt-R2-18を用いた場合も同様の結果が得られた。

【0047】

なお、図3において縦軸は、蛍光強度の一次導関数の逆符号の値 ($-dF/dt$)、横軸は温度 (℃) である。

【0048】

【発明の効果】

本発明によれば、mt3243変異を検出するのに有効な消光プローブが提供され、さらに、それを用いるmt3243変異を検出する方法およびそのためのキットが提供される。T_m解析は数十秒で完了するため、検出に必要な時間が大幅に短縮出来る。プローブの存在下での核酸の増幅とT_m解析を組み合わせる本発明の好ましい態様によれば、核酸の増幅後にプローブのT_mを解析するだけなので、反応終了後増幅産物を取り扱う必要がない。よって、増幅産物による汚染の心配がない。また

、さらに、増幅に必要な機器と同じ機器で検出することが可能なので、容器を移動する必要すらない。よって、自動化も容易である。

【 0 0 4 9 】

【配列表】

<110> アークレイ株式会社(Arkray, Inc.)

<120> ミトコンドリアDNA 3 2 4 3 変異の検出法ならびにそのための核酸プローブおよびキット

<130> P-B1032

<160> 14

<210> 1

<211> 500

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> allele

<222> 243

<400> 1

ggacatcccg atggtgcagc cgctattaaa ggttcgtttg ttcaacgatt aaagtcctac	60
gtgatctgag ttcagaccgg agtaatccag gtcggtttct atctaccttc aaattcctcc	120
ctgtacgaaa ggacaagaga aataaggcct acttcacaaa ggccttccc ccgtaaata	180
tatcatctca acttagtatt ataccacac ccaccaaga acagggtttg ttaagatggc	240
agagcccgt aatcgcataa aacttaaaac tttacagtca gaggttcaat tcctcttctt	300
aacaacatac ccatggccaa ctcctactc ctattgtac ccattctaata cgcaatggca	360

ttcctaatgc ttaccgaacg aaaaattcta ggctatatac aactacgcaa aggccccaac 420
gtggtaggcc cctacgggct actacaaccc ttcgctgacg ccataaaact cttcaccaaa 480
gagcccctaa aaccgccac 500

<210> 2

<211> 500

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> allele

<222> 243

<400> 2

ggacatcccg atggtgcagc cgctattaaa gggtcgtttg ttcaacgatt aaagtcctac 60
gtgatctgag ttacagaccgg agtaatccag gtcggtttct atctaccttc aaattcctcc 120
ctgtacgaaa ggacaagaga aataaggcct acttcacaaa gcgccttccc ccgtaaataa 180
tatcatctca acttagtatt ataccacac ccaccaaga acagggtttg ttaagatggc 240
agggcccggt aatcgcataa aacttaaaac tttacagtca gaggttcaat tcctcttctt 300
aacaacatac ccatggccaa cctcctactc ctcatgtac ccattctaata cgcaatggca 360
ttcctaatgc ttaccgaacg aaaaattcta ggctatatac aactacgcaa aggccccaac 420
gtggtaggcc cctacgggct actacaaccc ttcgctgacg ccataaaact cttcaccaaa 480
gagcccctaa aaccgccac 500

<210> 3

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 3

catctcaact tagtattata cccacac

27

<210> 4

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 4

agaggaattg aacctctgac tg

22

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> probe

<400> 5

tttgtaaga tggcagggcc

20

<210> 6

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> probe

<400> 6

tttgtaaga tggcagggcc c

21

<210> 7

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> probe

<400> 7

gcgattaccg ggccctgcca tc

22

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> probe

<400> 8

ccgggccctg ccatcttaac

20

<210> 9

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> probe

<400> 9

ttaagatggc agggccc

17

<210> 10

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> probe

<400> 10

ttaagatggc agggcc

16

<210> 11

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> probe

<400> 11

gattaccggg ccctgccatc

20

<210> 12

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> probe

<400> 12

gcagggcccg gtaatc

16

<210> 13

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> probe

<400> 13

gggccctgcc atcttaac

18

<210> 14

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> probe

<400> 14

ggccctgccca tcttaac

17

【図面の簡単な説明】

【図 1】 変異の識別不可能な消光プローブの位置を示す。

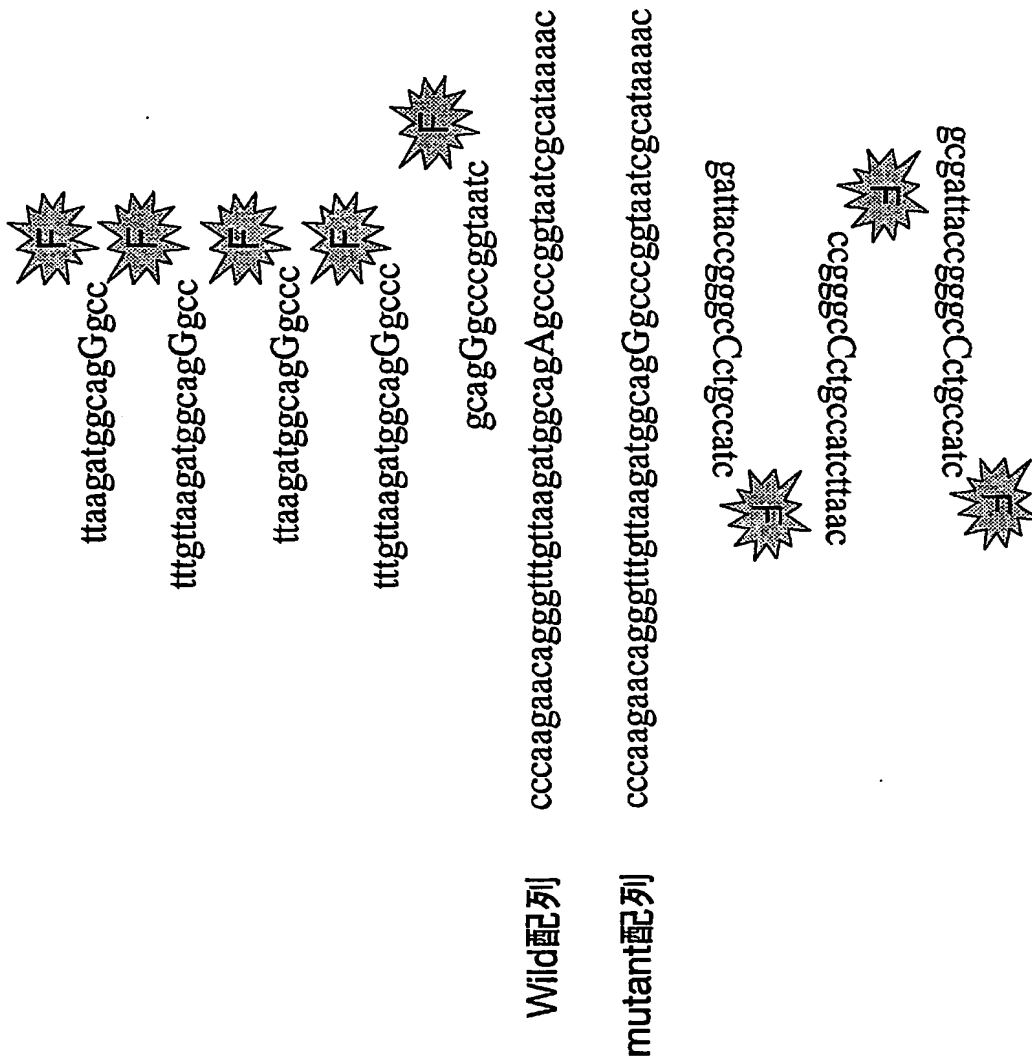
【図 2】 変異の識別可能な消光プローブの位置を示す。

【図 3】 実施例 1 の方法による変異遺伝子の割合の異なる試料における検出の結果を示す。

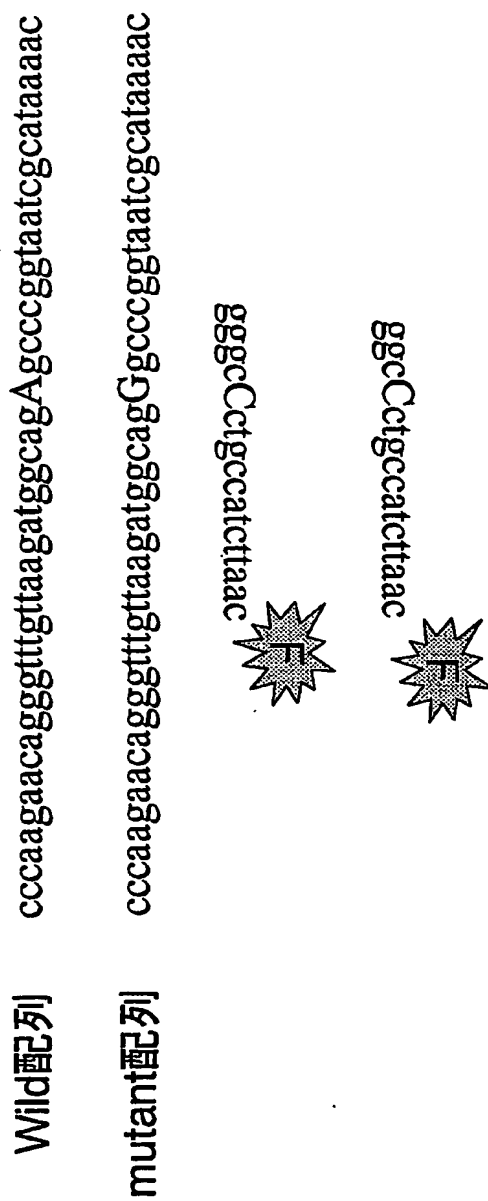
【書類名】

図面

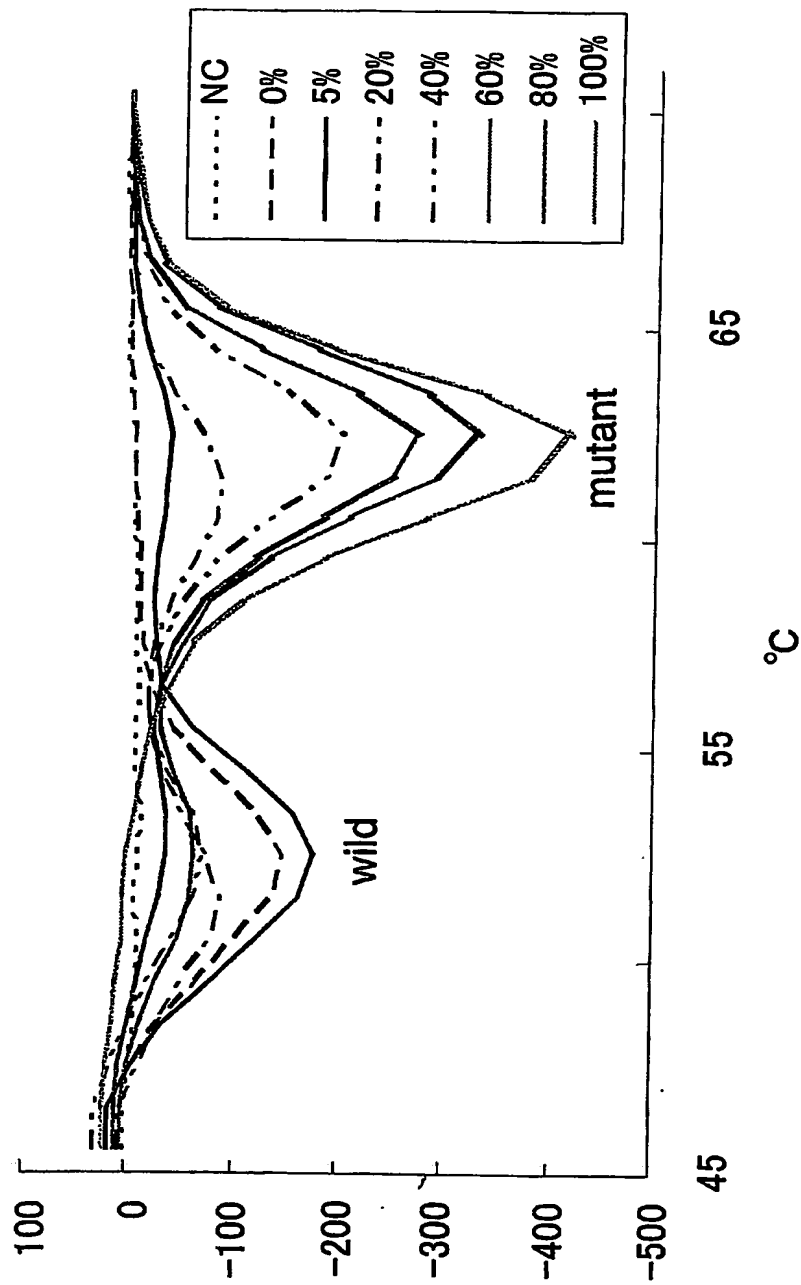
【図 1】



【図 2】



【図 3】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 ミトコンドリアDNA 3243位の変異 (mt3243変異) を検出する方法を提供する。

【解決手段】 mt3243変異を含む領域をPCRで増幅し、末端が蛍光色素で標識され、ハイブリダイゼーションしたときに蛍光色素の蛍光が減少する核酸プローブであって、配列番号2に示す塩基配列において塩基番号230から始まる14～40塩基長の塩基配列に相補的な塩基配列を有し、3'末端が蛍光色素で標識されている核酸プローブを用いて、蛍光色素の蛍光を測定することにより融解曲線分析を行い、融解曲線分析の結果に基づいて変異を検出する。

【選択図】 図3

特願 2003-114382

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[000141897]

1. 変更年月日

2000年 6月12日

[変更理由]

名称変更

住 所

京都府京都市南区東九条西明田町57番地

氏 名

アークレイ株式会社

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.